

|         |   |          |           |
|---------|---|----------|-----------|
| 氏名      | 何 桂 新   |          |           |
| 授与した学位  | 博 士   |          |           |
| 専攻分野の名称 | 薬 学   |          |           |
| 学位授与番号  | 博甲第2704号  |          |           |
| 学位授与の日付 | 平成16年 3月25日   |          |           |
| 学位授与の要件 | 自然科学研究科生体機能科学専攻<br>(学位規則第4条第1項該当)   |          |           |
| 学位論文の題目 | Molecular Genetic Analysis and Biochemical Characterization of PmpM, An H <sup>+</sup> -Coupled Multidrug Efflux Pump from <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>(緑膿菌の H <sup>+</sup> 共役型多剤排出ポンプ PmpM の分子遺伝学的及び生化学的解析) |          |           |
| 論文審査委員  | 教授 土屋 友房  | 教授 森山 芳則 | 助教授 中尾 浩史 |

#### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

I cloned the gene *pmpM* of *Pseudomonas aeruginosa* by the PCR method using the drug-hypersensitive *Escherichia coli* KAM32 as a host. Cells of *E. coli* transformed with a plasmid carrying the *pmpM* gene of *P. aeruginosa* showed increased resistance against norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, benzalkonium chloride, ethidium bromide, acriflavine, chlorhexidine-gluconate, fradiomycin, rodamine 6G and tetraphenyl-phosphonium chloride (TPPCL). I observed Na<sup>+</sup>-independent efflux activity of ethidium bromide from the cell carrying the PmpM. I detected H<sup>+</sup>-flux from everted membrane vesicles possessing the PmpM caused by benzalkonium chloride, a substrate of the pump involved. Thus, I concluded that the PmpM is an H<sup>+</sup>-drug antiporter, but not an Na<sup>+</sup>-drug antiporter. To our knowledge, this is the first case of an H<sup>+</sup>-coupled multidrug efflux pump in the MATE family.

Deletion and re-introduction of the *pmpM* gene in *P. aeruginosa* revealed that the PmpM is functional and that acriflavine, fluoroquinolones, TPPCL, benzalkonium chloride and ethidium bromide are substrates for the PmpM in this microorganism. Furthermore, I found that the PmpM is expressed constitutively to some extent in wild-type *P. aeruginosa*, and is further induced by several drugs. Inducers of the PmpM include clinically important antimicrobial drugs, such as ciprofloxacin, norfloxacin, fradiomycin, kanamycin, chlorhexidine-gluconate, and benzalkonium chloride.

## 論文審査結果の要旨

緑膿菌は院内感染、日和見感染の原因菌の一つであり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に次いで患者数が多いものである。緑膿菌は多くの抗菌薬に耐性を示すため、緑膿菌感染症の治療は大変難しい。その最大の理由は、この菌が活発な多剤排出ポンプをたくさん持っているからである。緑膿菌のゲノムシーケンスから、この菌には36個の多剤排出ポンプ遺伝子が存在すると推定されている。それらの中ですでに解析され性質等が報告されたものは数個に過ぎず、多くの多剤排出については未解析である。36個の推定多剤排出ポンプは5つのファミリーに分類される。それらの内のMATEファミリー多剤排出ポンプは、著者の属する研究室で見出され解析されたものである。緑膿菌には1つだけこのファミリーの多剤排出ポンプがある。著者はゲノムシーケンスに基づき、その遺伝子のPCRクローニングを行った。そしてそれを *pmpM* と名付けた。まず大腸菌を宿主として、抗菌スペクトル、多剤耐性パターン、実際に *PmpM* が排出ポンプであることなどを明らかにした。次に緑膿菌細胞内で発現させ、抗菌薬耐性パターンを解析した。一方、駆動力の解析を行い、このポンプが  $H^+$  を共役カチオンとすることを明らかにした。MATEファミリーで最初の例（他は  $Na^+$  型）である。遺伝子破壊株を構築し、実際に *PmpM* がどの程度耐性に関与しているのかを明らかにした。さらに、この多剤排出ポンプがいくつかの抗菌薬によって発現誘導されることを明らかにしている。

この論文は緑膿菌の多剤耐性に関与する多剤排出ポンプ *PmpM* について遺伝子面、生化学面から解析したものであり、学術上大変興味深い。

審査委員会はこの論文が博士（薬学）の学位に値するものと判断する。